

Aus dem Robert-Koch-Institut Berlin
Abteilung für Bakteriologie und Seuchenforschung
Direktor: Professor Dr. med. Hansjürgen Raettig

EINFLUSS DER ORALEN IMMUNISIERUNG
AUF DIE PHAGOZYTLOSEFÄHIGKEIT
VON PERITONEALMAKROPHAGEN DER MAUS

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den
Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Hans-Jürgen Schulze
aus Berlin

1972

Aus dem Robert-Koch-Institut Berlin
Abteilung für Bakteriologie und Seuchenforschung
Direktor: Professor Dr. med. Hansjürgen Raettig

EINFLUSS DER ORALEN IMMUNISIERUNG
AUF DIE PHAGOZYTOSEFÄHIGKEIT
VON PERITONEALMAKROPHAGEN DER MAUS

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den
Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Hans-Jürgen Schulze
aus Berlin

Referent: Professor Dr. med. Hansjürgen Raettig

Korreferent: Professor Dr. med. Klaus Großgebauer

**Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin**

Promoviert am: 18.10.1972



BRUNNEN

BRUNNEN

BRUNNEN

BRUNNEN

Meinen Eltern zugeeignet

BRUNNEN

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	3
MATERIAL UND METHODEN	8
1. Versuchstiere	8
2. Antigene und deren Gewinnung	8
3. Immunisierung	9
4. Kulturmedium	10
5. Serumgewinnung	10
6. Zellgewinnung	10
7. Bestimmung humoraler Antikörper im Blut der Versuchstiere	11
8. Versuchsansatz	12
9. Auswertung der Versuche	14
DIE VERSUCHE UND IHRE ERGEBNISSE	16
1. Versuchsgruppen und Beschreibung der Ergebnisse	16
2. Statistische Sicherung	17
3. Vorversuche	18
DISKUSSION	27
1. Vergleich der Ergebnisse mit den in der Literatur beschrieben	27
2. Wirkung der oralen Immunisierung im Vergleich zur parenteralen	28
3. Die unspezifische Wirkung der oralen Immunisierung	29
4. Abhängigkeit der Phagozytose von spe- zifischen Antikörpern	30
ZUSAMMENFASSUNG	31
LITERATURVERZEICHNIS	33

EINLEITUNG

Seit den ersten Experimenten Paul Ehrlichs zur oralen Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Antigenen (9) ist bisher eine sehr umfangreiche Literatur zu dieser Fragestellung entstanden. Die orale Immunisierung stand immer etwas im Schatten der parenteralen. Der Grund dafür lag darin, daß sich der Wunsch nach möglichst exakter Beschreibung eines Impferfolges dadurch erfüllte, daß man im Nachweis zirkulierender Antikörper nach parenteraler Impfung eine gut zu handhabende Methode besaß, deren Ergebnisse auch eine differenzierte Beurteilung der Impfung zuließen. Man glaubte auch lange Zeit im humoralen Antikörpersystem den entscheidenden Mechanismus der Infektabwehr überhaupt erkannt zu haben, und beurteilte daher andere Impfmethoden, die nur einen geringen und unsicheren humoralen Antikörperanstieg hervorriefen, wie z. B. die orale Impfung, mit entsprechendem Mißtrauen. Eine zusammenfassende Übersicht über die historische Entwicklung der lokalen und damit auch der oralen Immunisierung ist bei Breuel gegeben (4).

In den letzten Jahren konnte jedoch belegt werden, daß nicht allein der humorale Antikörpertiter für den Schutz einer Impfung ausschlaggebend ist, sondern zellgebundene Antikörper (50) und lokale Immunsysteme, wie z. B. das der Darmschleimhaut, ganz wesentlich an der Infektabwehr beteiligt sind (21, 40). Seitdem gewinnt auch die orale Immunisierung wieder an Interesse, besonders gilt das, seitdem man sich nicht mehr allein auf die Ergebnisse von Mortalitätsversuchen zu stützen braucht, die von vielen schwer zu definierenden Bedingungen abhängen, sondern es durch Techniken, wie z. B. die Agar-Plaques-Technik und ihre Modifikationen (15), gelingt, auch nach oraler Immunisierung immunkompetente Zellen und ihre Aktivitäten direkt nachzuweisen.

So gelang es Werner, Levèvre und Raettig (57), nach oraler Immunisierung mit Hammelerythrozyten in der Darmschleimhaut der Maus eine starke Vermehrung von Zellen nachzuweisen, die in der Lage sind, Immunglobuline der Klassen IgA, IgG und IgM zu bilden.

Wenn man weiterhin die Ausführungen von Wernet et al. (58) berücksichtigt, die für das sekretorische IgA des Darmes eine Opsoninwirkung nachweisen, und außerdem die Existenz und Wirkungsweise der Coproantikörper in die Überlegungen mit einbezieht (20; 41; 52; 12), zeichnet sich damit der durchaus wahrscheinliche Wirkungsmechanismus eines lokalen Immunsystems des Darms ab, das weitgehend unabhängig vom humoralen System der lymphatischen Organe ist und das sehr wohl in der Lage sein könnte, den im Mortalitätsversuch gefundenen Schutz der oralen Immunisierung zu erklären.

Gegen Ende des vergangenen Jahrhunderts stellte Robert Koch die Spezifitätslehre, d. h. die "Lehre von den charakteristischen, konstanten Arten der Spaltpilze als Ursache verschiedener Krankheiten" auf, und Pasteur beschrieb in ersten Arbeiten über künstliche, aktive Immunisierung die Spezifität von Bakteriengiften. Metschnikoff entwickelte umfassende Vorstellungen über die Immunität, deren Kernstück seine Phagozytentheorie war (28), und Besredka konnte die Wirksamkeit der lokalen Immunisierung, insbesondere der oralen Immunisierung mit abgetöteten Bakterien gegen Darminfektionen, in vielen Tier- und Feldversuchen nachweisen (3).

Neben diesen Erkenntnissen wurde aber schon bald die Erfahrung gemacht, daß es neben dem spezifischen Schutz nach einer Impfung auch einen unspezifischen gibt. Die Grundlagen für die unspezifische Impfung legte Richard Pfeiffer mit seinen exakten Forschungen über die Choleraimmunität (33), indem er anhand seiner Ergebnisse die Begriffe "spezifisch-unspezifisch", "Immunität" und "Resistenz" definierte.

Die unspezifische Schutzwirkung wurde später von vielen Autoren be-

stätigt: Roux (43) fand beim Meerschweinchen, daß eine vorausgegangene Impfung gegen Rauschbrand zugleich auch gegen "Bazillen des malignen Ödems" schützte. Pawlowsky berichtete über die Heilung des Milzbrandes durch Erysipel- und Pneumokokken (32), Emmerich heilte den Kaninchenmilzbrand durch Einimpfen von Erysipelkokken und versuchte, auch so die Kaninchentuberkulose zu heilen (10; 11). Er sieht die Wirkung dieser Therapie in der Aktivierung zellularchemischer Vorgänge durch die Kokken. Rumpf behandelte erfolgreich den Abdominaltyphus beim Menschen mit abgetöteten Kulturen von *Pyozyaneus* (46).

Pawlowsky fand 1894 als Ursache für die unspezifische Beeinflussung des Milzbrandes durch Proteine eine verstärkte Phagozytose (32).

Andere Autoren wieder konnten eine Steigerung der allgemeinen Abwehr dadurch erzielen, daß sie die Tiere nicht mit Bakterien sondern Organextrakten oder anderem, sogar anorganischen Material behandelten.

Behring fand einen erhöhten Schutz gegen Diphtherie nach Vorbehandlung der Kaninchen mit Wasserstoffsuperoxyd, Kitasato erhielt einen relativen Schutz gegen Tetanus nach Vorbehandlung mit Jodtrichlorid (2). Schließlich ist seit dem "Kochschen Grundversuch" von 1891 das Interferenzphänomen bekannt, d. h., daß eine Zweitinfektion schwerer angeht bei Bestehen einer chronischen Infektionskrankheit, wie z. B. Tuberkulose, Lepra oder Syphilis.

So wie in der Literatur immer wieder für die parenterale Impfung ein unspezifischer Schutz beschrieben wurde, ist von einigen Autoren auch für die orale Impfung ein solcher gefunden worden. Yoshida berichtete, daß nach Verfütterung von zwei Salmonellenstämmen eine Schutzwirkung auch bei Infektionsbelastung mit dem heterologen Keim auftrat (59). Raettig fand, daß die sogenannte "Dreckimmunisierung" während des Zweiten Weltkrieges zu einer erstaunlichen, unspezifischen Grundimmu-

nität führte, die ihre Wirkung auch noch in späteren Jahren zeigte (35). Weiter berichtet Raettig darüber, daß Mäuse gegen eine Infektion mit *Salmonella typhimurium* partiell durch eine orale Immunisierung mit *S. enteritidis* bzw. mit einem kommerziellen Typhus-Paratyphus-Impfstoff geschützt werden können (36). Lietz erhielt ähnliche Ergebnisse nach oraler Coliimpfung und nachfolgender intraperitonealer Belastung mit einem heterologen Keim (22). Mochmann, Ocklitz und Mitarbeiter berichteten über eine deutliche, wenn auch nicht sehr gute, unspezifische Schutzwirkung nach Gabe von monovalentem Desoxycholat-Coliimpfstoff und guten Ergebnissen nach Gabe eines bivalenten Impfstoffs, wenn anschließend mit einem anderen Colistamm infiziert wurde (29). Neumann-Schönwetter berichtet über eine erfolgreiche orale Impfung mit inaktivierten Poliomyelitisviren gegen nachfolgende Belastung mit Columbia-SK-Viren (31). Raettig hatte sogar unerwartet guten Erfolg, als er oral mit abgetöteten *Salmonella typhimurium*-Keimen immunisierte und oral mit Columbia-SK-Viren infizierte (37). In diesem Versuch ließ sich die Mortalität um fast die Hälfte senken, und die mittlere Überlebenszeit war deutlich verlängert.

Wenn auch für einige der zitierten Ergebnisse Kreuzreaktionen als Ursache des damit nicht mehr eigentlich unspezifischen Schutzes angenommen werden müssen, so bleiben doch viele Ergebnisse, für die ein prinzipiell unspezifischer Mechanismus angenommen werden muß.

Der Nachweis immunkompetenter Zellen in Darmschleimhaut und Milz der Maus nach oraler Immunisierung, wie sie Werner, Levèvre und Raettig beschrieben, demonstriert das spezifische Ergebnis einer abgelaufenen immunologischen Reaktionskette. Am Anfang dieses immunologischen Geschehens steht jedoch die Antigenaufnahme, d. h. die Phagozytose.

Ich wollte nun versuchen, Aufschluß über diesen ersten Schritt des immunologischen Geschehens nach oraler Immunisierung zu erhalten, und untersuchen, ob die Aktivität von Phagozyten sich so beeinflussen läßt.

Die Phagozytose ist sicher durch spezifische Antikörper zu steigern. So werden z. B. nach Antigen-Antikörper-Reaktion und weiterer Reaktion mit bestimmten Komponenten des Komplements die Reaktionsprodukte leichter phagozytiert (45; 47; 5). Das primäre Phänomen der Phagozytose ist jedoch unspezifischer Natur, denn auch erstmalig in den Organismus eindringendes Material wird phagozytiert, desgleichen solches, das im immunologischen Sinn keinen Antigencharakter hat und gegen das demzufolge auch keine Antikörper gebildet werden. Daher erschien mir ein Phagozytosemodell ebenfalls geeignet, möglicherweise Auskunft über die unspezifischen Komponente des Impfschutzes nach oraler Immunisierung zu erhalten.

MATERIAL UND METHODEN

1. Versuchstiere

Es wurden für alle Versuche sowohl als Zellspender wie auch als Serumspender weiße NMRI-(Naval Medical Research Institut)-Mäuse beiderlei Geschlechts aus der Zucht des Bundesgesundheitsamtes verwendet.

Die Zellspender waren in Plastikkäfigen zu jeweils zwölf Tieren untergebracht und wogen bei Versuchsbeginn etwa 20 g. Zur Serumgewinnung wurden möglichst junge Tiere verwendet, ihr Gewicht betrug etwa 15 g. Ernährt wurden die Tiere mit Altromin und Leitungswasser.

2. Antigene und deren Gewinnung

Um die Unspezifität der Phagozytose zu belegen wurden zwei Bakterienstämme verwandt, die keine Antigengemeinschaft haben, nämlich *Salmonella typhi-murium* und Streptokokken der Gruppe B. Von beiden wurde auf folgende Art und Weise ein Totimpfstoff hergestellt:

Herstellung des Salmonellenimpfstoffs: 200 ml Bouillon wurden mit einer Öse Keimmaterial beimpft und fünf Stunden bei 37 °C inkubiert. Von dieser Fünf-Stunden-Kultur wurden jeweils fünf Milliliter auf 4 %igem Agar in großen Petrischalen ausgestrichen. Nach 24-stündiger Bebrütung bei 37 °C konnten dann die Keime mit phosphatgepufferter NaCl-Lösung abgeschwemmt werden. Die so gewonnenen Keime wurden dreimal mit gepufferter NaCl-Lösung gewaschen. Nachdem eine Probe der Suspension für die Keimzählung abgenommen worden war, erfolgte die Inaktivierung, indem der Impfstoff für drei Minuten auf 100 °C erhitzt wurde (19).

Sterilitätskontrollen wurden in Bouillon angesetzt und 48 Stunden bei 37 °C gehalten. Anhand des Ergebnisses der Keimzählung konnte dann die endgültige Keimdichte eingestellt werden.

Die Herstellung der Totvaccine aus Streptokokken erfolgte in gleicher Weise, nur daß in diesem Falle Blutagarplatten (Zusatz von 10 % Hammelblut) verwandt wurden.

Die so aufgearbeiteten Streptokokken wurden nicht nur zum Immunisieren verwendet, sondern stellten auch gleichzeitig das zu phagozytierende Material dar.

3. Immunisierung

a) Orale Immunisierung

Die Tiere erhielten an zehn aufeinanderfolgenden Tagen mit der Schlundsonde jeweils 0,25 ml der Bakteriensuspension. Die Keimdichte der Suspension betrug 4×10^9 Keime pro ml, so daß nach zehn Tagen jede Maus eine Gesamtdosis von 1×10^{10} Keimen erhalten hatte.

b) Parenterale Immunisierung

Die Tiere erhielten an drei Tagen einer zehntägigen Periode, nämlich am ersten, fünften und zehnten Tag, jeweils 0,1 ml einer Keimsuspension, die $3,3 \times 10^9$ Bakterien/ml enthielt, in die Schwanzvene injiziert. Jedes Tier erhielt so eine Gesamtdosis von 1×10^9 Keimen während der Immunisierungsperiode.

Die Gesamtdosis liegt damit bei der oralen Impfung um das zehnfache höher als bei der parenteralen. Nach Raettig und Buse (38) erhält man zwar erst mit der einhundertfachen Dosis den gleichen Impferfolg gemessen am Anstieg der humoralen Antikörper, jedoch ist der im Mortalitätsversuch nachzuweisende Impfschutz schon mit der zehnfachen Dosis bei oraler Impfung dem nach parenteraler Impfung gleich. Da die postulierte Aktivierung der Makrophagen nicht in einem Zusammenhang mit dem humoralen Antikörpertiter zu stehen braucht, orientierte ich mich am effektiven Impfschutz und wählte daher für die orale Immunisierung die zehnfach höhere Dosis.

4. Kulturmedium

In allen Versuchen wurde als Nähr- und Kulturflüssigkeit Eagle-Basal-Medium mit Zusatz von Earle's-Salt und L-Glutamin verwendet. Die fertige Trockensubstanz wurde von der Firma Mecron bezogen. Für jeden Versuchsansatz wurde die Lösung neu hergestellt und mit Natriumbicarbonat auf pH 7,4 eingestellt, ein weiterer Zusatz bestand in 4E Heparin, wenn das Medium zum Spülen der Bauchhöhle verwendet wurde.

5. Serumgewinnung

Durch Eröffnung der Halsschlagader wurden die Tiere ausgeblutet. Das Blut wurde in Zentrifugenröhrchen gesammelt und die Zellen nach Abstechen des Blutkuchens 30 min lang bei 3000 U/min abzentrifugiert. Das überstehende Serum wurde mit Seitzfiltern sterilisiert und bis zur Verwendung bei -35°C aufbewahrt.

6. Zellgewinnung

In der Literatur werden die verschiedensten Phagozytosemodelle beschrieben.

Einige Autoren, z. B. Wagner (55), Jenkins und Rowley (14), Stiffel (51), Rother (42), Buschmann (6), injizieren das zu phagozytierende Material dem Versuchstier intravenös und messen die Phagozytose des gesamten histiozytären Systems anhand der Blutclearance, andere, wie Manwaring (25) und Koenig (17), messen die Clearance unter Perfusion isolierter Organe. Hirsch und Strauß (13), Mackaness (23; 24), Matsumi (26), Zarafonitis (60), Smith (49) und andere gewannen Peritonealmakrophagen durch Spülung der Bauchhöhle, zum Teil nach Instillation von verschiedenen Reizstoffen. Rowley und Thöni (45) injizierten die Keime in die Peritonealhöhle und ließen sie dort von den Makrophagen aufnehmen, während Victor, Bell und Pollak (53; 54),

Munger und Huddleson (30) in citrathaltigem oder heparinisiertem Blut die Leukozyten anreicherten oder daraus isolierten und mit diesen Zellsuspensionen ihre Phagozytoseversuche unternahmen.

Die Vielfalt der verwendeten Zellen und unterschiedlichen Beeinflussungen der Zellen durch die verschiedenen Behandlungsmethoden machen einen Vergleich der Ergebnisse und eine Beurteilung schwierig.

Nach längeren Versuchsreihen, in denen ich viele der Methoden ausprobierte und wobei durchaus nicht alle Methoden reproduzierbar erschienen, entschied ich mich, um eine möglichst homogene, genau definierte und möglichst wenig durch Zusätze und Manipulationen veränderte Zellpopulation zu erhalten, dafür, ohne Benutzung von Reizstoffen die Bauchhöhle der Versuchstiere mit Nährmedium zu spülen und mit den so gewonnenen Peritonealmakrophagen die Versuche durchzuführen.

Die Mäuse wurden getötet und das Bauchfell abgezogen, wobei strikt darauf geachtet wurde, die Bauchdecken nicht zu verletzen. Nachdem die Bauchdecken oberflächlich mit sechzigprozentigem Alkohol desinfiziert worden waren, konnten zwei Milliliter Kulturmedium in die Bauchhöhle mit dünner Kanüle injiziert werden, und nach 30 Sekunden leichter Massage des Bauches wurden 1-1,5 ml einer Zellsuspension abgezogen, die in der Regel zwischen 1×10^5 und 1×10^6 Zellen/ml enthielt.

7. Bestimmung humoraler Antikörper im Blut der Versuchstiere

In den beiden Versuchen, in denen die Tiere oral immunisiert wurden und im Kontrollversuch ohne Immunisierung wurden die humoralen Antikörper nach Widal sowohl gegen Salmonellen als auch gegen Streptokokken bestimmt. Damit sollte gezeigt werden, daß trotz geringer humoraler Antikörpertiter nach oraler Immunisierung eine damit nicht korrelierte gute Antwort im Phagozytoseversuch gefunden wird und daß bei der Phagozytose des heterologen Keims gegen diesen überhaupt kein Titer besteht und trotzdem eine starke Stimulierung der Phagozyten stattfindet.

Nach Abzentrifugieren der Zellen wurde eine Serumverdünnungsreihe angefertigt, deren Stufen auf ihre Agglutinationsfähigkeit Salmonellen und Streptokokken gegenüber geprüft wurden. Abgelesen wurde nach 2 1/2 h bei 37 °C und nach weiteren 18 h bei Zimmertemperatur.

Als positiv galt die Titerstufe, bei der makroskopisch noch eine Agglutination sicher festzustellen war. In den Tabellen wurden die 18-Stundenwerte angegeben, sie lagen in einigen Fällen um eine Titerstufe über den 2 1/2-Stundenwerten.

8. Versuchsansatz

Die Methode der hier verwendeten Zellgewinnung und des weiteren Versuchsablaufs sind im Prinzip bei Mackaness beschrieben (23; 24). Eine ähnliche Versuchsanordnung wird weiterhin bei Cohn und Morse angegeben (8). Innerhalb von 30 min sedimentieren die Makrophagen und haften fest auf der Unterlage. Als Zeichen einer stattgehabten Aktivierung durch eine Immunisierung entwickeln die Zellen sowohl in vivo als auch in vitro bestimmte morphologische Kriterien, die sich in vitro folgendermaßen darstellen: Die Zellen haben Ausläufer gebildet, sind vergrößert, der Kern ist aufgelockert und das Protoplasma vakuolisiert als Zeichen der Pinozytoseaktivität. Nach 24 Stunden sind diese Zeichen voll ausgebildet, wobei nach Immunisierung der Versuchstiere diese morphologischen Veränderungen schneller ablaufen (8; 24). Mackaness beschreibt, daß nach BCG-Impfung bei Mäusen innerhalb von 15 min die dann gewonnenen Makrophagen fest auf der Unterlage haften und sich dort ausgebreitet haben, während die unbehandelten Mäuse diesen Zustand nach 3 Stunden noch nicht erreicht haben (24).

Die Versuchsanordnung von Mackaness ist jedoch ziemlich aufwendig. Die Sedimentation der Zellen erfolgt in einer speziellen Kammer, die später mit einer Spülvorrichtung, die nach dem Springbrunnenprinzip arbeitet, weiterbehandelt wird. Die Apparaturen sind kompliziert und

waren zur Zeit nicht zu beschaffen, so daß ich mich bemühte, eine vereinfachte Methode zu finden.

Umfangreiche Versuchsreihen mit dem Ziel, auf Objektträgern zu arbeiten, die gemeinsam in einem größeren Glasgefäß untergebracht waren, scheiterten daran, daß die Gefahr der bakteriellen Kontamination zu groß war und auch die Probleme der konstanten Wasserdampfsättigung und CO_2 -Spannung nicht zufriedenstellend gelöst werden konnten. Aus ähnlichen Gründen führten auch Versuche mit Petrischalen und anderen Gefäßen als Versuchsträger nicht zum Erfolg, vor allem ließen sich diese Ansätze nicht spülen, so daß ein Mediumwechsel zur Entfernung von Serumresten und nicht sedimentierten Zellen nicht mit der erforderlichen Exaktheit durchgeführt werden konnte. Erst durch Verwendung von Gewebekulturflaschen aus Plastik, die sich verschließen ließen, war es möglich, ausreichend genau die Versuchsbedingungen einzuhalten, so daß Ausfälle selten waren und nur noch gelegentlich die eine oder andere Präparation mißlang.

In 30 ml-Gewebekulturflaschen aus Plastik der Firma Falcon werden 3 ml Eagle-Basal-Medium gegeben. Mit dünner Pipette wird Preßluft, die 5 % CO_2 enthält, eingeleitet, um eine Äquilibration des Mediums mit der Kohlensäure zu erreichen und so die physiologische CO_2 -Spannung zu erhalten.

In die so vorbereiteten Flaschen werden etwa 1 ml der gewonnenen Zellsuspension gefüllt. Nach 30 min bei Zimmertemperatur haften die Makrophagen so fest, daß dreimal mit gepufferter NaCl-Lösung gespült werden kann. Dadurch werden restliche Serumbestandteile und Zellen, wie Erythrozyten, Lymphozyten und polymorphkernige Leukozyten, entfernt, die zu einem bestimmten Prozentsatz enthalten sind.

Jede Flasche wird jetzt mit 4 ml Kulturmedium beschickt, das 25 % Mäuseserum enthält. Das Äquilibrieren mit 5 % CO_2 enthaltender Luft wird wie oben beschrieben durchgeführt. Nach 24 h bei 37 °C befindet sich auf dem Flaschenboden eine gleichmäßige Schicht aktivierter

Makrophagen (siehe Bild 1).

Pro Flasche werden jetzt 0,01 ml einer Suspension von abgetöteten Streptokokken zugesetzt, deren Keimkonzentration 1×10^9 /ml ist.

Nach einer weiteren Stunde bei 37°C werden die Flaschen mit physiologischer NaCl-Lösung gespült, der Boden abgeschnitten, getrocknet, das Präparat in Methylalkohol fixiert und nach Giemsa gefärbt.

Mit der Trypanblau-Vitalfärbung konnte gezeigt werden, daß nach 24 h in der Regel 90 - 95 % der Zellen am Leben waren.

Die Versuche wurden in Impfkapseln vorgenommen, die wenigstens 24 h mit UV-Licht ausgestrahlt worden waren, desgleichen stand der Raum, in dem gearbeitet wurde, unter kontinuierlicher UV-Deckenbestrahlung. Durch diese Maßnahmen und das Einhalten möglichst steriler Bedingungen konnte auf den Zusatz eines Antibiotikums verzichtet werden.

9. Auswertung der Versuche

Auf diese Weise wurde von jeder Maus ein Präparat hergestellt. Die Auswertung erfolgte unter dem Mikroskop mit der Ölimmersion bei eintausendfacher Vergrößerung. Insgesamt 500 Zellen aus allen Abschnitten des Präparats wurden geprüft, ob sie phagozytiert hatten oder nicht, wobei die Zahl der phagozytierten einzelnen Keime unberücksichtigt blieb. Als positiv wurden nur die Zellen bewertet, in denen die Keime eindeutig als solche zu erkennen waren, d.h., daß in der Regel wenigstens drei Kokken in einer Reihe lagen (siehe Bild Nr. 2).

Die Gesamtzahl der geprüften Zellen wurde gleich 100 gesetzt, die Zahl der Zellen, die phagozytiert hatten, wurde in Prozent davon ausgedrückt.

Da die Makrophagen fest auf der Unterlage hafteten, konnte relativ intensiv gespült werden, so daß extrazellulär gelegene Bakterien fast vollständig entfernt wurden. Daher lagen auch kaum Bakterien auf den

Zellen, so daß der Fehler, der entstand, wenn diese Bakterien als phagozytiert gewertet wurden, ohne Bedeutung war, wofür auch der Ausfall des Kontrollversuchs spricht.

DIE VERSUCHE UND IHRE ERGEBNISSE

1. Versuchsansatz und Beschreibung der Ergebnisse

Die Versuchstiere wurden in fünf Gruppen eingeteilt und die Tiere der verschiedenen Gruppen folgendermaßen geimpft:

Gruppe 1: Streptokokkenimpfstoff i. v.

Gruppe 2: Streptokokkenimpfstoff oral

Gruppe 3: Salmonellenimpfstoff i. v.

Gruppe 4: Salmonellenimpfstoff oral

Gruppe 5: nicht geimpft

Die Immunisierung erfolgte nach dem oben angegebenen Schema. Alle Tiere wurden jeweils sechs Tage nach der letzten Immunisierung getötet und die Makrophagen gewonnen.

Die Gruppen 1 und 2 gaben also Auskunft über den spezifischen Impferfolg, die Gruppen 3 und 4 über den unspezifischen. Gruppe fünf war Kontrollgruppe.

In den folgenden Tabellen 1 bis 5 sind die Ergebnisse der fünf Versuche wiedergegeben, in einer weiteren Abbildung sind die Ergebnisse noch einmal zusammengefaßt und graphisch dargestellt, indem der jeweilige Mittelwert durch die Höhe der Säule dargestellt ist.

Aus den Ergebnissen geht eindeutig hervor, daß dem Kontrollversuch Nr. 5 gegenüber in allen anderen Versuchen die Immunisierung eine signifikante Steigerung der Phagozytose erbrachte. Darüber hinaus ist festzustellen, daß die orale Impfung mindestens genauso gut wirkt wie die parenterale, denn beide Versuche mit oral immunisierten Tieren liegen im Mittelwert um sechs beziehungsweise sieben Prozent über den Werten der entsprechenden i. v. -immunisierten Gruppe.

Die weitergehende Feststellung, daß die orale Impfung besser wirkt als die parenterale, kann hier höchstens als Vermutung geäußert wer-

den, denn bei der Anzahl der verwendeten Versuchstiere kann eine solche Schlußfolgerung nicht statistisch gesichert werden. Auffällig ist jedoch, daß diese Differenz von sechs bzw. sieben Prozent mit fast völliger Übereinstimmung sowohl bei den salmonellen- als auch bei den streptokokkenimmunisierten Tieren auftrat.

Aus den zu den Versuchen 2, 4 und 5 angegebenen Antikörpertitern im Serum geht hervor, daß die Tiere nach oraler Immunisierung mit nur geringen Titern von spezifischen, humoralen Antikörpern reagieren, wie das auch nach der Literatur zu erwarten war (38). Ein Titer von Bedeutung gegen den heterologen Keim konnte in keinem Fall nachgewiesen werden. Die gelegentlich in der ersten Verdünnungsstufe noch beobachteten Agglutinationen waren so gering, daß sie nicht mit Sicherheit als positiv gewertet werden konnten, sie wurden daher mit einem Fragezeichen versehen und hier nur der Vollständigkeit halber angegeben.

2. Statistische Sicherung

Für die mittlere Streuung innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen ergaben sich folgende Werte:

	Zellen insges.	pos. Phagoz.	mittlere Streuung
Gruppe 1:	4000	68 %	4,6 %
Gruppe 2:	3500	75 %	4,9 %
Gruppe 3:	4000	80 %	3,3 %
Gruppe 4:	4500	86 %	5,1 %
Gruppe 5:	4000	38 %	5,8 %

Diese niedrigen Werte für die mittlere Streuung und der Umstand, daß in keiner Gruppe Einzelwerte vorkommen, die weit vom Gruppenmittel entfernt sind, lassen den Schluß zu, daß es von Maus zu Maus keine ins Gewicht fallende Unterschiede im Reaktionsausfall gegeben hat, die durch unterschiedliche Behandlung der Zellen oder durch unter-

schiedliche Wirkung der Methode auf die verschiedenen Präparationen bedingt sind. Vielmehr sind diese geringen Werte für die mittlere Streuung dadurch zu erklären, daß sie Ausdruck der natürlichen biologischen Reaktionsbreite sind. Diese natürlichen Schwankungen können sowohl von Tier zu Tier als auch von Zelle zu Zelle auftreten.

Es ist daher erlaubt, alle ausgezählten Zellen einer Versuchsgruppe als untereinander vergleichbar anzusehen, so daß man bei der Bestimmung der statistischen Echtheit von der Gesamtzahl der Zellen in einer Versuchsgruppe ausgehen kann. Dann ergeben sich nach den Kollerschen Tafeln (18) für die größtzulässigen Zufallsdifferenzen in den einzelnen Gruppen folgende Werte:

	Zellen ges.	pos. Phagoz.	pos. Ph in %	größtzul. Zufallsd.
Gruppe 1:	4000	2739	68	3,2 %
Gruppe 2:	3500	2619	75	3,4 %
Gruppe 3:	4000	3225	80	2,7 %
Gruppe 4:	4500	3884	86	2,2 %
Gruppe 5:	4000	1519	38	3,3 %

Diese Werte ergeben eine sehr hohe statistische Echtheit und belegen damit eine hohe Signifikanz der Ergebnisse.

3. Vorversuche

Die hier beschriebenen Ergebnisse sind die des Hauptversuchs. Wie weiter oben schon erwähnt, wurden aber umfangreiche Vorversuche gemacht, von denen sich ein erheblicher Teil von dem endgültigen Hauptversuch nur in geringfügigen Änderungen der Methode unterschied, so z. B. in einer Dosisänderung der zu phagozytierenden Streptokokken, Änderung des Serumanteils im Kulturmedium oder Änderung der Inkubationszeit. Diese Versuche waren also nicht ganz identisch mit dem Hauptversuch, und ihre Ergebnisse wurden daher zahlenmäßig in dieser Arbeit nicht aufgeführt.

Aus diesen Versuchen, die aber in Prinzip funktionierten, ergab sich eine Bestätigung der hier wiedergegebenen Ergebnisse.

Es gelang mir ebenfalls mit Versuchen, die ich nach Abschluß dieser Arbeit vornahm, diese Ergebnisse zu reproduzieren. In neueren Versuchen verwandte ich anstatt Mäuseserum ein Serum von neugeborenen Kälbern in unterschiedlicher Konzentration. Dabei zeigten sich sinngemäß sehr ähnliche Ergebnisse.



Bild Nr. 1: Aktiviererte Zellen. (160fach)



Bild Nr. 2: Zellen mit phagozytierten
Streptokokkenketten. (1200fach)

Tier Nr.	Zellen		%
	gesamt	pos. Ph.	
I	500	373	75
II	500	364	73
III	500	315	63
IV	500	331	66
V	500	321	64
VI	500	357	71
VII	500	366	73
VIII	500	312	62
	4000	2739	
=====			

Insgesamt 4000 Zellen, davon haben
2739 phagozytiert, das entspricht 68 %

Tabelle Nr. 1: Reaktion der Makrophagen nach i.v.-Immunisierung mit Streptokokken.

Tier Nr.	Zellen		%	Agglutinationstiter gegen	
	gesamt	pos. Ph.		Salmonellen	Streptokokken
I	500	338	67	-	1 : 4
II	500	378	76	-	1 : 2
III	500	402	80	1 : 2 ?	1 : 4
IV	500	412	82	-	1 : 4
V	500	388	78	-	1 : 4
VI	500	331	66	-	1 : 4
VII	500	370	74	-	1 : 2
	3500	2619			

Insgesamt 3500 Zellen, davon haben
2619 phagozytiert, das entspricht
75 %

keine Spontan-
agglutination
in NaCl

Tabelle Nr. 2: Reaktion der Makrophagen nach oraler Immunisierung
mit Streptokokken.

Tier Nr.	Zellen		%
	gesamt	pos. Ph.	
I	500	402	80
II	500	380	76
III	500	386	77
IV	500	420	84
V	500	376	75
VI	500	413	82
VII	500	437	87
VIII	500	411	82
	4000	3225	

Insgesamt 4000 Zellen, davon haben
3225 phagozytiert, das entspricht 80 %

Tabelle Nr. 3: Reaktion der Makrophagen nach i.v.-Immunisierung mit Salmonellen.

Tier Nr.	Zellen		%	Agglutinationstiter gegen	
	gesamt	pos. Ph.		Salmonellen	Streptokokken
I	500	422	84	1 : 2	1 : 2 ?
II	500	419	84	-	-
III	500	394	79	1 : 4	-
IV	500	471	94	1 : 2	-
V	500	485	97	1 : 8	1 : 2 ?
VI	500	405	81	1 : 2	-
VII	500	456	91	1 : 8	..
VIII	500	400	80	1 : 2	-
IX	500	432	86	1 : 4	-
	4500	3884			

Insgesamt 4500 Zellen, davon haben
3884 phagozytiert, das entspricht
86 %

keine Spontan-
agglutination
in NaCl

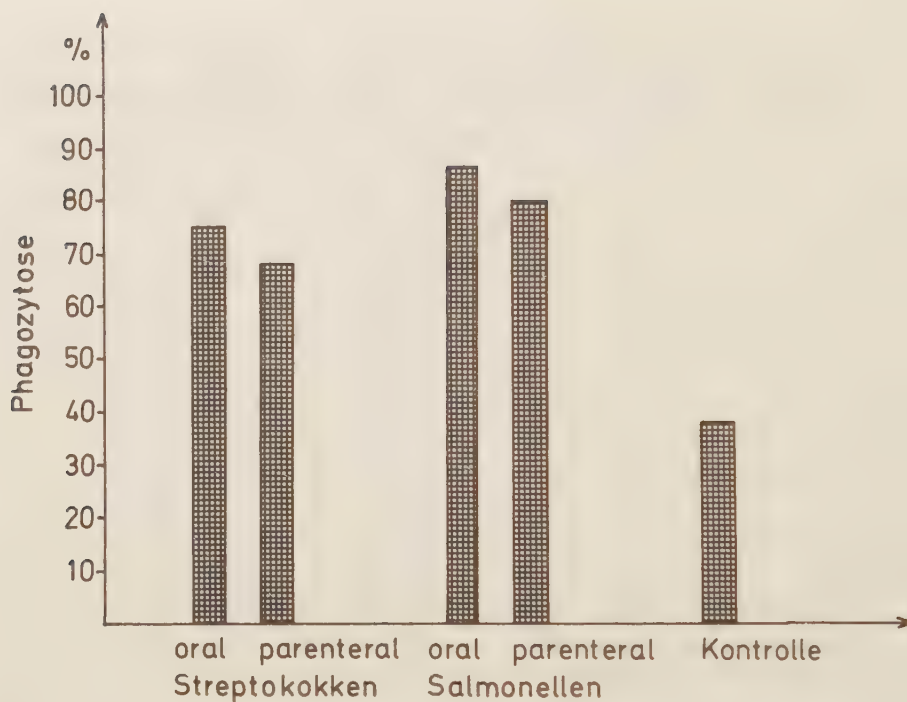
Tabelle Nr. 4: Reaktion der Makrophagen nach oraler Immunisierung
mit Salmonellen.

Tier Nr.	Zellen		%	Agglutinationstiter gegen	
	gesamt	pos. Ph.		Streptokokken	Salmonellen
I	500	189	38	kein Titer	kein Titer
II	500	211	42	- " -	- " -
III	500	204	41	- " -	- " -
IV	500	235	47	- " -	- " -
V	500	160	32	- " -	- " -
VI	500	153	31	- " -	- " -
VII	500	141	28	- " -	- " -
VIII	500	226	45	- " -	- " -
	4000	1519			

Insgesamt 4000 Zellen, davon haben
1519 phagozytiert, das entspricht
38 %

keine Spontan-
agglutination
in NaCl

Tabelle Nr. 5: Reaktion der Makrophagen ohne vorherige Immuni-
sierung.



Zusammenfassende Darstellung der Versuchsergebnisse. Die Stab-
lensäulehöhe gibt den Anteil der Zellen, die phagozytiert haben, in
Prozenten von der Gesamtzahl der pro Gruppe ausgezählten Zel-
len an.

DISKUSSION

Sehr eingehende Untersuchungen haben, wie oben zitiert, zum Verhalten der Makrophagen nach parenteraler Impfung stattgefunden.

Unbeschadet der Frage, ob zur Phagozytose Komplement notwendig ist oder nicht, ob spezifische Antikörper benötigt werden, und anderer noch strittiger Fragen, werden bestimmte Grundvorstellungen über die Phagozytose nicht mehr in Frage gestellt.

Aus der Literatur kann man entnehmen, daß Übereinstimmung in folgenden Punkten besteht:

- 1) Die Phagozytose als solche stellt einen wesentlichen Faktor in der Infektabwehr des Organismus dar.
- 2) Sie ist gleichzeitig der erste und essentielle Schritt in der Auseinandersetzung des Organismus mit dem als fremd erkannten Material und ist damit der Anfang jenes Mechanismus, der zu einer Immunantwort führt.
- 3) Durch parenteralen Antigenreiz wird die Phagozytosefähigkeit gesteigert.
- 4) Diese Aktivitätssteigerung geht einher mit einer Aktivierung der Phagozyten, die sowohl in vivo stattfindet als auch in vitro demonstriert werden kann.

Die Phagozytose und ihre qualitative und quantitative Änderung durch eine Immunisierung stellen einen Parameter dar, um den Effekt eben dieser Immunisierung zu beschreiben.

1. Vergleich der hier referierten Ergebnisse mit denen in der Literatur beschriebenen

Cohn und Benson (7) und Mackaness (24) beschreiben morphologische Veränderungen der Makrophagen als Ausdruck der gesteigerten Aktivi-

tät. Diese Aktivitätssteigerung findet sowohl in vivo als auch in vitro statt. So beschreibt Mackaness, daß die Makrophagen innerhalb von 15 bis 30 Minuten auf der Unterlage haften, nach zwölf Stunden vergrößert sind, Ausläufer gebildet haben und als Ausdruck ihrer Pinozytoseaktivität vakuolisiert sind. Genau diese Entwicklung nahmen die hier verwendeten Zellen ebenfalls, wie aus den Bildern zu ersehen ist. Ich konnte in Übereinstimmung mit den Angaben von Mackaness auch feststellen, daß die Aktivierung schneller und die Aktivierungszeichen ausgeprägter waren bei Zellen, die aus immunisierten Tieren gewonnen worden waren. Es kann daraus geschlossen werden, daß das Verhalten der hier verwendeten Zellen das gleiche war, wie das in der Literatur beschriebene.

Ebenfalls in Übereinstimmung mit der Literatur steht der Befund, daß durch parenterale Immunisierung die Phagozytosefähigkeit der Makrophagen gesteigert werden kann und daß dieser Effekt auch unspezifisch ist, d. h. nach stattgehabter Immunisierung auch andere Keime verstärkt phagozytiert werden.

Aus diesen Übereinstimmungen geht also hervor, daß die hier dargestellten Ergebnisse mit denen aus der Literatur vergleichbar sind.

2. Wirkung der oralen Immunisierung im Vergleich zur parenteralen

Aus den Versuchen Nr. 2 und Nr. 4 geht hervor, daß nach oraler Immunisierung eine gute Steigerung der Phagozytose stattfindet, die quantitativ mindestens genauso groß ist wie die Steigerung nach parenteraler Immunisierung. Die Impfdosis war bei der oralen Immunisierung um das zehnfache höher als bei der parenteralen. Im Schutzversuch hatte sich gezeigt, daß dann der Erfolg beider Impfmengen gleich groß ist, obwohl der humorale Antikörpertiter dabei nach oraler Immunisierung nur sehr niedrig und inkonstant ist. Auch für die Phagozytose läßt sich nun feststellen, daß die Steigerung nach oraler Immunisierung eine ähnliche Abhängigkeit von der Impfdosis zeigt wie der Impfschutz, nämlich daß

mit der zehnfachen Dosis der parenteralen Impfung bei oraler Applikation der gleiche Erfolg wie nach parenteraler Impfung erreicht wird. Umgekehrt besteht keine quantitative Abhängigkeit der Phagozytose vom humoralen Antikörpertiter.

Es scheint viel eher, daß die Wirkung der oralen Immunisierung ganz wesentlich von der Reaktionsfähigkeit der Makrophagen abhängt. Walker (56) beschreibt, daß Makrophagen Antikörper bilden, sie aber nicht unbedingt freisetzen und weiter, daß nach Ficoll-Fraktionierung der Makrophagen aus den verschiedenen Fraktionen Ribonukleinsäuren gewonnen werden konnten, die in der Lage waren, Lymphozyten zur IgM und IgG-Produktion zu stimulieren. Das bedeutet, daß hier die Reaktionskette von der Antigenaufnahme bis hin zur fertigen Information für die Antikörpersynthese abgelaufen ist, ohne daß sofort ein humoraler Antikörpertiter auftreten muß.

Das humorale Antikörper produzierende System der lymphatischen Organe wird durch die orale Immunisierung primär nur geringfügig stimuliert, wie auch die hier vorgelegten Ergebnisse der Antikörperbestimmung zeigen. Wenn aber statt der Stimulierung der lymphatischen Organe die Makrophagenaktivierung stattfindet und die zitierten Reaktionen ablaufen, wäre zu erwarten, daß bei nochmaligem Antigenkontakt eine schnelle immunologische Sekundärantwort abläuft, nun auch mit entsprechenden humoralen Antikörpertitern. Genau dieses Ergebnis fand Raettig (39), als er nach oraler Immunisierung infizierte bzw. einen Booster setzte. Dabei war die Fähigkeit der Mäuse, mit einer kräftigen Sekundärantwort zu reagieren, über 250 Tage, d. h. über die Hälfte eines normalen Mäuselebens, erhalten geblieben.

3. Die unspezifische Wirkung der oralen Immunisierung

Die Ergebnisse der Versuche Nr. 3 und Nr. 4 zeigen die unspezifische Wirkung der oralen Immunisierung auf die Phagozytose. Wie oben schon erwähnt, ist die unspezifische Stimulierung der Phagozyten nach paren-

teraler Immunisierung bekannt.

Diese Ergebnisse zeigen nun, daß auch nach oraler Immunisierung eine quantitativ gleichwertige Stimulierung der Phagozyten stattfindet. Sowohl nach parenteraler als auch nach oraler Impfung ist die Wirkung dem heterologen Keim gegenüber besser als dem homologen. Diese Differenzen sind zwar bei der geringen Fallzahl statistisch nicht zu sichern, da sie aber in genau der gleichen Größenordnung liegen, kann vermutet werden, daß das Ergebnis nicht rein zufällig ist. Dieser Frage sollte in weiteren Untersuchungen nachgegangen werden.

Der Umstand, daß der unspezifische Impferfolg in der gleichen Größenordnung liegt wie der spezifische, könnte aber auch ein Hinweis dafür sein, daß für die Phagozytosesteigerung entscheidend ist, daß eine Aktivierung der Makrophagen stattgefunden hat, und nicht, daß die phagozytierten Keime die gleichen sind, mit denen immunisiert wurde, d. h., daß die Spezifität nicht von entscheidender Bedeutung ist. Eine mögliche Erklärung dafür, daß die Immunisierung mit Salmonellen ein besseres Ergebnis hat als die mit Streptokokken, könnte darin gesehen werden, daß verschiedene Bakterienarten einen unterschiedlichen Stimulierungseffekt auf die Makrophagen ausüben.

4. Abhängigkeit der Phagozytose von spezifischen Antikörpern

Nach Rowley (44) sind zur Phagozytose in jedem Fall spezifische Antikörper nötig. Mackaness u. a. teilen diese Meinung nicht. Da nach Walker (56) Makrophagen nach Immunisierung selbst Antikörper produzieren können, muß angenommen werden, daß in dem verwendeten Versuchssystem über die Makrophagen spezifische Antikörper enthalten sind, obwohl durch die vorgenommenen Spülungen etwaige Serumreste eliminiert wurden. Diese Quelle für Antikörper kann aber nur für die Phagozytose des homologen Keims eine Rolle spielen, während in den Versuchen, in denen der heterologe Keim phagozytiert wurde, wohl weder auf humoralem, noch auf zellulärem Wege spezifische Antikörper

in das Versuchssystem gelangen konnten.

Dem Kulturmedium wurde Mäuseserum zugesetzt, und es kann nicht ausgeschlossen werden, daß das eine oder andere Tier vor der Serumgewinnung mit den zur Phagozytose verwendeten Streptokokken in Berührung gekommen ist und daher spezifische Antikörper im Medium enthalten sein könnten.

Andere Autoren jedoch haben mit fötalem Kalbsserum gearbeitet, und auch ich habe in neuesten Versuchen Serum von neugeborenen Kälbern verwendet, die höchstens acht Tage alt waren bei Serumgewinnung. Auch unter diesen Bedingungen konnte ich die Ergebnisse reproduzieren. Aber auch hier kann nicht mit letzter Sicherheit angenommen werden, daß keine spezifischen Antikörper enthalten sind, da die Möglichkeit besteht, daß diese schon diaplazentar auf die Kälber übertragen wurden und so doch in das Versuchssystem gelangen konnten.

Wenn man alle diese Möglichkeiten berücksichtigt, kann man die Anwesenheit von spezifischen Antikörpern nicht ausschließen, die Wahrscheinlichkeit spricht jedoch dafür, daß spezifische Antikörper nicht, zumindestens nicht in nennenswertem Umfang für die Phagozytose erforderlich sind.

ZUSAMMENFASSUNG

Eine vereinfachte Methode zur Untersuchung der Phagozytosefähigkeit von Peritonealmakrophagen der Maus wird angegeben.

Nach oraler Immunisierung ist bei zehnfach höherer Antigendosis die Phagozytosesteigerung genauso groß wie nach parenteraler Immunisierung.

Diese Steigerung ist unabhängig vom humoralen Antikörpertiter.

Die Bedeutung der Makrophagenfunktion für den oralen Impferfolg wird diskutiert.

In diesem Versuchsmodell erweist sich die unspezifische Wirkung der Impfung als genauso groß wie die spezifische.

Es scheint, als würde die Phagozytose unabhängig von spezifischen Antikörpern, zumindestens unabhängig von nennenswerten Mengen dieser Antikörper ablaufen.

Die Ergebnisse werden anhand der Literatur diskutiert.

LITERATURVERZEICHNIS

1. BAUMGARTNER, W. Die Hämopsoninprobe in vitro
MÜLLER, U. Helvetica Med. Acta 19 S. 66 1952
2. BEHRING Über das Zustandekommen der Diphtherieimmunität und der Tetanusimmunität bei Tieren.
KITASATO Dtsch. med. Wschr. 49 S. 1113 1890
3. BESREDKA, A. Die lokale Immunisierung
Leipzig 1926
4. BREUEL, H. Lokale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen.
Inaug. Diss. F.U. Berlin 1969
5. BROGAN, T. Mechanism of Phagocytosis in Human Polymorphonuclear Leucocytes
Immunology 10 S. 137 1966
6. BUSCHMANN, H. Methoden und Erfahrungen bei der Prüfung von resistenzfördernden Präparaten
PREUSS, W. Zschr. f. Imm. All. u. kl. Immun. 136
S. 457 1968
7. COHN, Z. The In Vitro Differentiation of Mononuclear Phagocytes.
BENSON, B. J. exp. Med. 121 S. 835 1965
8. COHN, Z. Interactions Between Rabbit Polymorphonuclear Leucocytes and Staphylococci.
MORSE, S. J. exp. Med. 110 S. 419 1959
9. EHRLICH, P. Experimentelle Untersuchungen über Immunität.
Dtsch. med. Wschr. 32 S. 976 u. 44 S. 1213 1891
10. EMMERICH, R. Die Heilung des Milzbrandes
Arch. f. Hyg. 6 S. 442 1887
11. EMMERICH, R. Die Heilung des Milzbrandes durch Erysipelserum und Vorschläge über die ätiologische Behandlung von Krebs und anderen malignen Neubildungen.
Münchn. med. Wschr. 28 S. 549 1894

12. FRETER, R.
GANGAROSA, E. Oral Immunization and Production of Coproantibody in Human Volunteers
J. Immunol. 91 S. 724 1963
13. HIRSCH, J.
STRAUß, B. Studies on Heat-labile Opsonins in Rabbit Serum.
J. Immunol. 92 S. 145 1964
14. JENKINS, C.
ROWLEY, D. The Role of Opsonins of Living and Inert Particles of the RES.
J. exp. Med. 114 S. 363 1961
15. JERNE, N.
NORDIN, A.
HENRY, C. The Agar-Plaque Technique for Recognizing Antibody-Producing Cells.
Wistar Inst. Press 109 1963
16. KINNE-SAFRAN, E.
KURSCHILGEN, E.
MARQUARDSEN, A.
RAETTIG, H. Orale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen. 9. Mitteilung: Tierversuche zur Schutzimpfung gegen Infektionen durch enteritiserregende Salmonellen.
Ztrbl. f. Bakt. I Orig. 208 S. 37 1968
17. KOENIG, G.
MELLY, M.
GOODMAN, J.
ROGERS, D. Serum Factors and the Reticuloendothelial Uptake of Staphylococcus Aureus.
I. The Role of Whole Serum
J. Immunol. 100 S. 516 1968
18. KOLLER, S. Graphische Tafeln zur Berechnung statistischer Zahlen.
Theodor Steinkopf Dresden und Leipzig
19. KORDES, I.
KORDES, B.
PICHL, H.
GANZE, B.
RAETTIG, H. Orale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen. 12. Mitteilung: Immunogenität verschieden inaktivierter Salmonella typhimurium-Vollantigene im Mäuseschutzversuch.
Zbl. f. Bakt. I. Orig. A 217 S. 242 1971
20. KOSHLAND, M. The Origin of Fecal Antibody and its Relationship to Immunization with Adjuvant.
J. Immunol. 70 S. 359 1952
21. LEVANON, Y.
RAETTIG, H.
ROSSETINI, S. Positive Immunological Reaction of Gut Cells from Orally Immunized Animals Demonstrated by Passive Cutaneous Anaphylaxis. Experientia 24 S. 600 1968

33. PFEIFFER, R.
ISSAEFF
Über die spezifische Bedeutung der Coleraimmunität.
Zschr.f. Hyg. 17 S. 355 1894
34. RAETTIG, H.
Orale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen. 1. Mitteilung: Der Grundversuch zur Schutzimpfung der Maus gegen eine Enteritis-Infektion.
Zbl. f. Bakt. I Orig. 193 S. 398 1964
35. RAETTIG, H.
Typhusimmunität und Schutzimpfung.
Verlag Gustav Fischer Jena 1952
36. RAETTIG, H.
Orale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen. 2. Mitteilung: Experimente zur unspezifischen Schutzimpfung bei der Enteritis-Infektion der Maus.
Zbl. f. Bakt. I. Orig. 197 S. 368 1965
37. RAETTIG, H.
Neue Modellversuche zur Infektabwehr des Darmes. Zbl.f. Bakt. I Orig. 198 S. 206 1965
38. RAETTIG, H.
BUSE, A.
Orale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen. 4. Mitteilung: Serumantikörper der Maus nach spezifischer Impfung gegen Salmonellen-Enteritis.
Zbl.f. Bakt. I. Orig. 204 S. 221 1967
39. RAETTIG, H.
BUSE, A.
Orale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen. 10. Mitteilung: Serologische Primär- und Sekundärantwort nach oraler Impfung mit Salmonella-typhimurium-Vollantigen im vergleichenden Tierexperiment.
Zbl. f. Bakt. I. Orig. 214 S. 216 1970
40. ROSSETINI, S.
LEVANON, Y.
RAETTIG, H.
Orale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen. 7. Mitteilung: Nachweis immunkompetenter Zellen im Dünndarm oral geimpfter Versuchstiere.
Zbl. f. Bakt. I. Orig. 208 S. 16 1968

41. ROTHBERG, R.
KRAFT, S.
FARR, R. Similarities Between Rabbit Antibodies Produced Following Ingestion of Bovine Serum Albumin and following Parenteral Immunization. *J. Immunol.* 98 S. 386 1967
42. ROTHER, K.
ROTHER, U. Studies on Complement Defective Rabbits IV: Blood-Clearance of Intravenously Injected *S. typhimurium* by the RES. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 119 S. 1055 1967
43. ROUX, E. Immunité contre le charbon symptomatique conférée par des substances solubles. *Ann. de l'Institut Pasteur* 2 S. 49 1888
44. ROWLEY, D.
AUZINS, I.
JENKIN, C. Further Studies Regarding the Question of Cellular Immunity in Mouse Typhoid. *Austr. J. of exp. Biol. med. Sci.* 46 S. 447 1968
45. ROWLEY, D.
THÖNI, M.
ISLIKER, H. Opsonic Requirements for Bacterial Phagocytosis. *Nature* 207 S. 210 1965
46. RUMPF, TH. Behandlung des Typhus abdominalis mit abgetöteten Kulturen des *Bazillus pyocyaneus*. *Dtsch. med. Wschr. Nr.* 41 S. 987 1893
47. SHILO, M. Nonspecific Resistance to Infection *Ann. Rev. Microbiol.* 13 S. 255 1959
48. SLOPEK, S. Opsonizing Factors in Human Serum. III: Phagocytosis of *Salmonella typhimurium*. *Arch. Imm. Therap. Exp.* 15 S. 26 1967
49. SMITH, TH.
WAGNER, R. Rabbit Macrophage Interferons. I: Conditions for Biosynthesis by Virus-Infected and Uninfected Cells. *J. exp. Med.* 125 S. 559 1967
50. STICKL, H.
GROTEMEYER, P. Vaccinaler Immuntransfer mit Zellfraktionen immun-kompetenter Zellen. *Z. med. Mikrob. u. Immunol.* 154 S. 80 1968
51. STIFFEL, C.
BIOZZI, G.
MOUTON, D.
BOUTHILLIER, Y.
DECREUSEFOND, C. Studies on Phagocytosis of Bacteria by the RES in Strain of Mice Lacking Hemolytic Complement. *J. Immunol.* 93 S. 246 1964

52. THIND, K. Studies on Coproantibody. II: The Origin and Nature of Coproantibody. Indian J. med. Res. 49 S. 223 1961
53. VICTOR, J. Mechanism of Citrate Inhibition of Phagocytosis and Opsonization. BEALL, F. J. of Inf. Dis. 94/95 S. 285 1954
54. VICTOR, J. Studies on Phagocytosis. Determination of Blood Opsonin for Brucella. POLLACK, A. J. of Bact. 64 S. 121 1952
RAYMOND, R.
VAILLIANT, J.
55. WAGNER, H. Studies of the RES. II: Changes in the Phagocytic Capacity of the RES in IIO, M. Patients with Certain Infections. HORNICK, R. J. of clin. Invest. 42 S. 427 1963
JABBOUR, B.
56. WALKER, W. Macrophage Functional Heterogeneity in the In Vitro Induced Immune Response. Nature, New Biol. 229 S. 211 1971
57. WERNER, H.-J. Biphasic Occurrence of IgM-forming LEVEVRE, H. Cells in the Intestine After Oral Immunization. RAETTIG, H. Nature 232 S. 119 1971
58. WERNET, P. Antibacterial Action of Specific IgA BREU, H. and Transport of IgM, IgA and IgG from KNOP, J. Serum into the Small Intestine. ROWLEY, D. J. of Inf. Dis. 124 S. 223 1971
59. YOSHIDA, E. Über Immunisierung per os. Arch f. Hyg. 69 S. 21 1909
60. ZARAFONETIS, C. The Influence of Temperature Upon HARMON, D. the Opsonization and Phagocytosis. CLARK, P. J. of Bact. 53 S. 343 1947

Herrn Professor Raettig danke ich für
die Überlassung des Themas und die
vielfältigen Ratschläge bei der Abfas-
sung der Arbeit.

Mein Dank gilt weiterhin Fräulein Ch.
Jaschinski und Frau A. Lissy für ihre
Hilfe bei der Durchführung der Ver-
suche.

LEBENS LAUF

Ich, Hans-Jürgen Schulze, wurde am 30.7.1943 als Sohn des Bäckermeisters Johannes Schulze und seiner Ehefrau Elisabeth, geb. Kutzer in Berlin geboren. Von 1949 bis 1956 besuchte ich die Grundschule in Berlin, von 1956 an die Walther-Rathenau-Schule, an der ich 1963 das Abitur ablegte. Im gleichen Jahr begann ich mit dem Medizinstudium und nach Studienaufenthalten in Münster, Heidelberg und Berlin bestand ich 1969 das Staatsexamen an der Freien Universität Berlin. Ich absolvierte meine Medizinalassistentenzeit an Berliner Krankenhäusern und bin seit dem 1.1.1971 als wissenschaftlicher Angestellter im Robert-Koch-Institut tätig.

